

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: Pierre MARRACCINI et al.

Confirmation No.: 4965

Application No.: 09/850,982

Group Art Unit: 1638

Filing Date: May 8, 2001

Examiner: R. Kallis

For: COFFEE MANNANASE

Attorney Docket No.: 88265-4025

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicants have claimed priority under 35 U.S.C. § 119 of European Application No. 98203742.6 filed November 9, 1998. In support of this claim, a certified copy of said application is submitted herewith.

No fee or certification is believed to be due for this submission. Should any fees be required, however, please charge such fees to Winston & Strawn Deposit Account No. 501-814.

Respectfully submitted,

9/4/03  
\_\_\_\_\_  
Date

  
\_\_\_\_\_  
Allan A. Fanucci, Reg. No. 30,256

**WINSTON & STRAWN**  
Customer No. 28765

202-371-5904





**Europäisches  
Patentamt**

**European  
Patent Office**

**Office européen  
des brevets**

**Bescheinigung**

**Certificate**

**Attestation**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

**Patentanmeldung Nr.    Patent application No.    Demande de brevet n°**

98203742.6

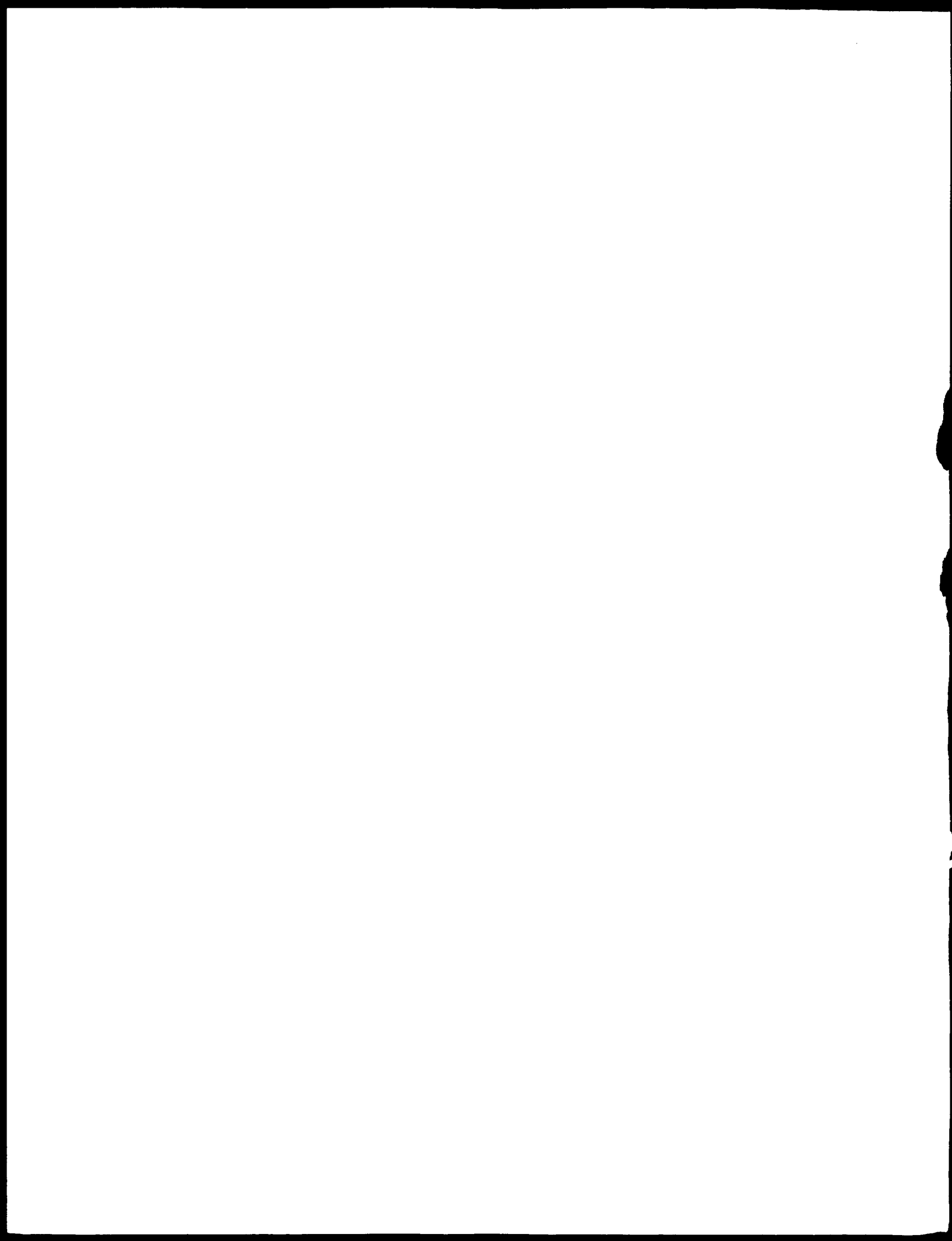
Der Präsident des Europäischen Patentamts:  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

**I.L.C. HATTEN-HECKMAN**

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE,    20/03/01  
LA HAYE, LE





Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.  
Application no.: 98203742.6  
Demande n°:

Anmeldetag  
Date of filing: 09/11/98  
Date de dépôt

Anmelder  
Applicant(s)  
Demandeur(s)  
SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.  
1800 Vevey  
SWITZERLAND

Bezeichnung der Erfindung  
Title of the invention  
Titre de l'invention  
Mannanase de Coffea arabica

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat  
State  
Pays

Tag  
Date  
Date

Aktenzeichen  
File no  
Numero de dépôt

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification  
Classification internationale des brevets

C12N15/56, C12N9/24, C12N5/10, C12Q1/68, A23F5/16, A61K31/70, A61K38/47, A61K7/00, A01H5/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE/■  
Etats contractants désignés lors du dépôt

Bemerkungen:  
Remarks  
Remarques

Pour le titre initial voir la page 1 de la description.



EPO - DG 1

09. 11. 1998

**Mannanase de café**

La présente invention se rapporte à l'utilisation de fragments d'ADN de café codant pour au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse des polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes simples ou ramifiées et liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).

ETAT DE LA TECHNIQUE:

Les polysaccharides qui contiennent du mannose sont fréquemment présents dans les parois cellulaires des végétaux supérieurs en particulier chez les légumineuses et sont considérés comme une réserve de carbohydrates dans les graines.

Dans plusieurs plantes, il a été montré que l'activité endo- $\beta$ -mannanase est principalement détectée dans l'endosperme des graines en cours de germination (Bewley, Trends Plant. Sci 2: 464-469, 1997).

Dans le grain de café, on trouve notamment des galactomannanes. Ces dernières représentent environ 24% du poids sec du grain (Bradbury and Halliday, J. Agric Food Chem 38: 389-392, 1990). Ces polysaccharides sont formés d'une chaîne linéaire de résidus mannosyl qui sont liés entre eux par des liaisons de type  $\beta$ -1->4 et sur laquelle sont fixés des monomères de résidus  $\alpha$ -galactosyl. Il est également connu que l'enzyme appelée endo- $\beta$ -mannanase (E.C 3.2.1.78) est une hydrolase qui dégrade les polymères de (1->4)-  $\beta$  -mannanes, ainsi facilitant la sortie de la radicule pendant la germination et libérant des petits oligosaccharides qui sont utilisés ensuite comme source d'énergie pour la croissance de la jeune plante.

Dans les procédés industriels, lors du traitement du café, les molécules de mannanes et leurs dérivés constituent une partie importante des sédiments insolubles. De plus, la fraction de ces molécules qui entre en solution lors de la première extraction (environ 50 %) est aussi très faiblement soluble, et est donc responsable pour la majorité des précipitations secondaire se manifestant pendant les étapes suivantes. Ainsi dans le brevet EP 0676145A1 il a été démontré qu'il est

possible d'hydrolyser les galactomannanes de café en utilisant une mannanase immobilisée extraite d'*Aspergillus niger*.

5 Ainsi à ce jour, aucun gène ou groupe de gènes codant pour au moins une enzyme issue du café impliquée dans l'hydrolyse des polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes simples ou ramifiées et liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4) n'a été identifié et/ou séquencé.

10 Ainsi il serait intéressant d'isoler de telles enzymes issues de la graine café.

#### RESUME DE L'INVENTION:

15 L'invention se destine donc à fournir de nouveaux moyens pour contrôler, modifier et/ou restaurer l'hydrolyse des polysaccharides de café constitués au moins de molécules de mannanes simples ou ramifiées et liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).

20 A cet effet la présente invention concerne tout fragment d'ADN issu du café codant pour au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de tels polysaccharides.

25 La présente invention concerne également l'utilisation de tout ou partie de tels fragments d'ADN comme amorce pour faire une PCR ou comme sonde pour détecter *in vitro* ou modifier *in vivo* au moins un gène de café codant pour au moins une endo- $\beta$ -mannanase.

30 La présente invention concerne également toute protéine issue de la graine de café codée par un gène de café et impliquée dans l'hydrolyse des polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes simples ou ramifiées et liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4) et ayant la séquence en acides aminée SEQ ID NO:2 ou toute séquence en acides aminés homologue à cette dernière.

35 Un autre objet de l'invention concerne tout microorganisme et de toute cellule végétale comprenant, intégré dans son génome ou par le moyen d'un plasmide replicable, un fragment d'ADN selon la présente invention.



Enfin l'invention concerne une composition alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique comprenant un fragment d'ADN ou une protéine selon l'invention.

5     DESCRIPTION DES FIGURES:

La figure 1 représente le plasmide pMAN1 de 3,58 kb.

La figure 2 représente le plasmide pMAN2 de 2,98 kb.

10     La figure 3 représente le plasmide pMAN3 de 3,78 kb.

La figure 4 représente le plasmide pMAN4 de 4,56 kb.

15     DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION:

Au sens de la présente invention, on entend par "séquence homologue" toute séquence nucléique ou d'acides aminés ayant une fonction identique, ne différant des séquences selon l'invention que par la substitution, la délétion ou  
20     l'addition d'un petit nombre de bases nucléiques ou d'acides aminés, par exemple 1 à 500 paires de bases (pb) ou 1 à 150 acides aminés.

Dans ce cadre, on considérera en particulier comme homologues deux séquences d'ADN qui, du fait de la dégénérescence du code génétique, codent  
25     pour un même polypeptide. De même, on considérera comme homologues deux protéines fonctionnelles qui sont reconnues par un même anticorps, le rapport des valeurs d'intensité de reconnaissance des deux protéines par l'anticorps n'excédant pas 100, par exemple.

30     On considérera aussi comme séquence homologue, celle qui présente plus de 70% d'homologie avec les séquences selon l'invention, en particulier plus de 80% ou 90%. Dans ce dernier cas, l'homologie est déterminée par le rapport entre le nombre de bases ou d'acides aminés d'une séquence homologue qui sont identiques à celles d'une séquence selon l'invention, et le nombre total de bases ou  
35     d'acides aminés de ladite séquence selon l'invention.

Au sens de la présente invention, on entend par "fragment qui s'hybride" tout fragment capable de s'hybrider aux fragments selon l'invention par la méthode de Southern-Blot (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989, chapitres 9.31 à 9.58). De  
5 préférence, l'hybridation est conduite dans des conditions stringentes de manière à éviter des hybridations aspécifiques ou peu stables.

Enfin, le terme "fragment" ou "fragment d'ADN" doit être compris comme un ADN double brin d'origine chromosomique, qui peut être synthétisé, reproduit  
10 *in-vitro* par exemple par la méthode connue appelée "Polymérase Chain Reaction", ou reproduit *in-vivo* dans une bactérie du type *Escherchia coli*, par exemple.

Dans la suite de la description, les séquences SEQ ID NO: font référence  
15 aux séquences présentées dans la liste des séquences ci-après. Les oligonucléotides de synthèse SEQ ID NO: 3 à SEQ ID NO: 7, mentionnés dans la description et présentés dans la liste des séquences ci-après, sont fournis par Eurogentec (Parc Scientifique du Sart Tilman-4102 Seraing-Belgium).

On a pu caractériser une séquence d'ADN de 1613 pb issue du café. Aussi  
20 la présente invention concerne tout fragment d'ADN issu du café codant pour au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiées liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).

De préférence, le fragment d'ADN issu du café selon l'invention code pour  
25 au moins une endo- $\beta$ -mannanase.

On a pu montrer que tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1 permet,  
30 suite à une transformation, d'hydrolyser des polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiées liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4) dans une cellule hôte, comme une cellule de plante ou un micro-organisme.

Vu l'intérêt de la présente invention, l'invention concerne tout fragment  
35 d'ADN ayant la séquence nucléique SEQ ID NO:1 ou tout fragment d'ADN homologue ou s'hybridant à cette séquence nucléique. De préférence, l'invention

concerne le fragment d'ADN délimité par les nucléotides 11 à 1292 de la séquence nucléique SEQ ID NO:1.

Ainsi, l'invention concerne aussi les nouvelles enzymes codées par les gènes de la séquence SEQ ID NO:1, notamment les séquences qui leur sont homologues. On peut ainsi envisager de les utiliser pour modifier ou dégrader *in-vitro* de tels polysaccharides, par exemple. Pour cela, il est préférable de purifier au moins une de ces enzymes, en surexprimant classiquement leur gène dans une bactérie et en les isolant classiquement, par précipitation et/ou chromatographie du milieu de culture, par exemple.

L'invention concerne également l'utilisation de tout ou partie de fragments d'ADN. On peut notamment utiliser tout ou partie de fragments d'ADN selon l'invention, d'au moins 10 pb, comme amorce pour faire une PCR ou comme sonde pour détecter *in vitro* ou modifier *in vivo* au moins un gène de café codant pour au moins une endo- $\beta$ -mannanase.

Par ailleurs, la présente invention a pour objet une protéine issue de la graine de café codée par un gène de café et impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiés liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4) et ayant la séquence en acides aminée SEQ ID NO:2 ou toute séquence en acides aminés homologue à cette dernière.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiées liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4), dans lequel (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour l'enzymes selon l'invention, ledit vecteur comprenant en outre une séquence permettant la répllication autonome ou l'intégration dans une cellule hôte, (2) on transforme une cellule hôte par ledit vecteur, (3) puis on cultive la cellule hôte transformée dans des conditions appropriées pour l'hydrolyse de tels polysaccharides.

La présente invention ouvre donc la possibilité d'utiliser des fragments d'ADN selon l'invention pour modifier la production de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiées liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4) dans une cellule hôte, notamment une cellule de grain de café. On peut ainsi envisager d'exprimer ou de surexprimer dans une cellule de grain de

café l'expression des ADN selon l'invention, pour produire de tels polysaccharides destinés à modifier l'arôme et la structure des grains de café, par exemple.

La présente invention permet aussi d'avoir des moyens nouveaux pour  
5 identifier des gènes de café impliqués dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiées liées entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4) .

Enfin, la présente invention fournit aussi de nouvelles enzymes impliquées  
10 dans l'hydrolyse de tels polysaccharides. Ces enzymes peuvent être ainsi avantageusement utilisées pour hydrolyser ou modifier *in-vitro* de tels polysaccharides.

La présente invention concerne également une cellule végétale comprenant,  
15 intégré dans son génome ou par le moyen d'un vecteur recombinant, un fragment d'ADN codant pour au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiés liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).

De préférence, cette cellule végétale comprend un fragment d'ADN ayant la  
20 séquence nucléotidique SEQ ID NO:1 ou un fragment d'ADN ayant une séquence nucléique homologue ou qui s'hybride à la séquence nucléique SEQ ID NO:1 ou un fragment d'ADN comprenant au moins les nucléotides 11 à 1292 de la séquence nucléique SEQ ID NO:1.

De préférence, cette cellule végétale est une cellule de café. On peut  
25 notamment choisir comme cellules de café des cellules issues de plante de *coffea canephora* var *robusta*, *coffea arabica* ou toute autre espèce du genre *coffea*.

La présente invention concerne également toute plante ou toute graine  
constituées de cellules végétales comprenant, intégré dans son génome ou par le  
30 moyen d'un vecteur recombinant, un fragment d'ADN codant pour au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiés liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).

Tout micro-organisme comprenant, intégré dans son génome ou par le  
35 moyen d'un plasmide replicable, un fragment d'ADN selon l'invention, de manière à ce qu'il exprime au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de

polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiés liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4), est également un objet de la présente invention.

5 Un autre objet de l'invention concerne toute composition alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique comprenant un fragment d'ADN selon l'invention ou une protéine selon l'invention.

10 Enfin, la présente invention concerne un procédé de traitement de grains de café, dans lequel on utilise toute ou partie de la protéine selon l'invention. On peut notamment utiliser toute ou partie de la protéine selon l'invention pour augmenter le pourcentage de matière sèche extraite, lors du traitement de grains de café. En utilisant toute ou partie de la protéine selon l'invention, on peut ainsi augmenter le rendement d'extraction tout en diminuant la quantité de sédiments.

15 Après surexpression du fragment d'ADN selon l'invention dans un micro-organisme, dans un champignon ou dans une cellule végétale indifférenciée, on peut traiter les sédiments avec l'enzyme plus ou moins purifiée, de manière ainsi à augmenter les rendements d'extraction.

20 Après surexpression du fragment d'ADN selon l'invention dans un micro-organisme, dans un champignon ou dans une cellule végétale indifférenciée, on peut également traiter la liqueur du café, de manière à diminuer la sédimentation dû aux mannanes qui gélifient.

25 La présente invention est décrite plus en détail ci-après à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention de fragments d'ADN, de plasmides recombinants et de bactéries transformées selon l'invention. Il va de soi, toutefois, que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation. La manipulation de l'ADN, le clonage et la transformation de cellules  
30 bactériennes sont, en l'absence de précisions contraires, effectués selon les protocoles décrits dans l'ouvrage de Sambrook *et al.* cité plus haut. Les pourcentages sont donnés en poids, sauf indication contraire.

#### **Test 1: Isolement de l'ADNc de l'endo- $\beta$ -mannanase de café**

1. Isolement des ARN totaux et des ARN messagers poly A+ à partir du grain de café en germination

Les graines de café (*Coffea arabica* var.2308) sont récoltées au stade  
5 mature, dépulpées immédiatement et séchées pendant trois jours à la température  
ambiante. Ces grains sont ensuite déparchés, séchés puis stérilisés pour être mis en  
germination en culture *in-vitro*. Pour ce faire, ils sont placés 1 heure dans du  
Rovral (0.12 % v/v), rincés à l'eau stérile, placés 1 heure dans une solution  
10 d'hypochlorite de calcium (6 % p/v) à laquelle on ajoute quelques gouttes  
d'émulsifiant Teepol, puis sont rincés par 4 passages à l'eau stérile avant d'être  
mis en culture dans des tubes à essai sur un milieu agar-eau. La germination se  
déroule à 25°C en présence de lumière. Le moment où les grains sont mis sur le lit  
d'agar est considéré comme jour après imbibition zero (JAI = 0).

15 On extrait les ARN totaux de grains après 22 jours de mise en germination  
(JAI 22).

Pour ce faire, on broie rapidement le grain dans de l'azote liquide et la  
poudre obtenue est resuspendue dans 8 ml de tampon à pH 8 contenant du Tris  
20 HCl 100 mM, 0,1% p/v de SDS et 0,5% v/v de  $\beta$ -mercaptoéthanol, on  
l'homogénéise avec un volume de phénol saturé en Tris HCl 100 mM pH 8, puis  
on centrifuge à 12000 g pendant 10 min. à 4°C, de manière à extraire la phase  
aqueuse que l'on centrifuge (i) une fois avec un volume équivalent de phénol, (ii)  
deux fois avec un volume équivalent de phénol:chloroforme (1:1) et (iii) deux fois  
25 avec un volume équivalent de chloroforme.

On précipite alors les acides nucléiques totaux pendant 1 h à -20°C en  
ajoutant à la phase aqueuse 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 et 2,5  
volumes d'éthanol.

30

Puis on centrifuge le tout à 12000 g pendant 30 min. à 4°C et l'on reprend  
le culot dans 10 ml d'H<sub>2</sub>O, avant de précipiter à nouveau les acides nucléiques en  
présence de LiCl (2 M final) et d'éthanol (2,5 volumes).

35 Après centrifugation, on reprend le culot d'ARN totaux dans 1 ml d'H<sub>2</sub>O et  
on le digère pendant 1h à 37°C à la DNase RQ1 (Promega Corporation, 2800

Woods Hollow Road, Madison, Wisconsin 53711 USA), afin d'éliminer toute trace d'ADN, puis, on déprotéinise les ARN totaux par un traitement au phénol et au chloroforme, avant de les précipiter en présence d'acétate de sodium comme décrit ci-dessus.

5

On reprend alors les ARN totaux dans 500 µl d'H<sub>2</sub>O et on les quantifie par dosage spectrophotométrique à 260 nm. Leur qualité est analysée par électrophorèse en gel d'agarose en présence de formaldéhyde.

10

Pour ce faire, on purifie ensuite les ARN messagers poly A<sup>+</sup> (ARNm) à partir de 500 µg d'ARN totaux en utilisant le système de purification Oligotex-dT (Qiagen INC., 9600 De Soto Avenue, Chatsworth, California, 91311 USA), puis on évalue la quantité des ARNm à l'aide du kit DNA Dipstick (InVitrogen BV, De Schelp 12, 9351 NV Leek, Netherlands).

15

## 2. Construction et criblage de la banque d'ADNc

On réalise la synthèse d'ADNc, nécessaire à la construction des banques, selon les recommandations fournies dans le kit "Riboclone cDNA synthesis system M-MLV (H-)" (Promega, USA), hormis l'étape de ligature des adaptateurs *Eco*RI. Ceci permet de cloner ces ADNc directement dans le vecteur pCR-Script SK(+) (Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, USA). L'efficacité de cette réaction de synthèse d'ADNc est suivie par l'addition d'alpha-(<sup>32</sup>P)-dCTP lors de la synthèse des deux brins d'ADN.

25

Après migration sur gel d'agarose alcalin (Sambrook *et al.*, 1989), on estime la taille des ADNc néosynthétisés comme variant de 0,2 à plus de 4,3 kb. Les quantifications, à l'aide du kit DNA Dipstick (InVitrogen BV, De Schelp 12, 9351 NV Leek, Netherlands), montrent qu'environ 100 ng d'ADNc sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARNm.

30

Les ADNc ligaturés dans le vecteur pCR-Script SK(+) (Stratagene, USA) ont été utilisés pour transformer la souche d'*E.coli* XL2-Blue MRF' (Stratagene, USA). On sélectionne les bactéries qui contiennent des vecteurs recombinants sur boîtes de milieu LB (Luria-Bertani) contenant 20 µg ml<sup>-1</sup> d'ampicilline, 80 µg ml<sup>-1</sup>

35

de méthicilline et en présence d'IPTG et de X-Gal (Sambrook *et al.*, 1989). On les cultive alors sur boîtes de pétri, pour obtenir environ 300 clones par boîte. On transfère ces clones sur filtre Nylon et on les traite ensuite selon les recommandations fournies par Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Postfach 310120, Mannheim 31, DE). On extrait également les plasmides de cette banque d'ADNc à partir d'une culture de nuit de ces transformants, en présence de 25 ml milieu LB contenant 50 µg ml<sup>-1</sup> d'ampicilline, et en utilisant le kit "QiaFilter Plasmid MidiKit" (Qiagen INC., USA).

### 3. Isolement de l'ADNc codant pour l'endo-β-mannanase de café

Dans une expérience préliminaire, on réalise la synthèse du premier brin d'ADNc selon les recommandations fournies dans le kit "Riboclone cDNA synthesis system M-MLV (H-)" (Promega, USA). L'efficacité de cette réaction est suivie par l'addition d'alpha-(<sup>32</sup>P)-dCTP lors de la synthèse d'ADNc.

On effectue ensuite la synthèse du deuxième brin de l'ADNc en effectuant une réaction de RT (Reverse Transcription)-PCR (US Patent 4,683,195 et US Patent 4,683,202) en utilisant l'oligonucléotide de synthèse MAN2, ayant la séquence nucléique SEQ ID NO:3, et l'oligonucléotide de synthèse DT15, ayant la séquence nucléique SEQ ID NO:4. L'oligonucléotide de synthèse MAN2 correspond à la séquence en acides aminés localisée entre les acides aminés 206 et 212 de la séquence protéique de *Lycopersicon esculentum* (Bewley *et al.*, Planta 203 : 454-459, 1997) qui est également conservée au sein des séquences protéiques d'endo-β-mannanase de *Trichoderma reesei* (Stalbrand *et al.*, GenBank Accession Number L25310, 1993) et d'*Aspergillus aculeatus* (Christgau *et al.*, Biochem Mol Biol Internat 33 : 917-925, 1994).

On réalise la réaction de PCR en présence de 1 à 10 ng de premier brin d'ADNc, dans un volume final de 50 µl contenant 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg ml<sup>-1</sup> gélatine, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,25 µM de chaque oligonucléotide (MAN2 et DT15) et 3 unités d'ADN polymérase *Taq* (Stratagene, USA). On recouvre le mélange réactionnel avec 50 µl d'huile minérale et on l'incube pendant 35 cycles (94° C-30 s, 45° C-30 s, 72° C-3 min.) suivi d'une extension finale à 72° C pendant 7 min. A l'issue de cette réaction, on obtient un produit majoritaire de PCR d'environ 600 pb qui a été purifié sur gel d'électrophorèse en utilisant le système d'extraction d'ADN « Gel Nebulizer – Micropure 0.22 µm » (Amicon INC., 72 Cherry Hill Drive, Beverly,



Massachusetts 01915 USA). Ce fragment est traité avec l'ADN polymérase *Pfu* (Stratagene, USA) pour convertir ses extrémités cohésives en extrémités franches. Cette réaction s'effectue dans un volume final de 13  $\mu$ l contenant environ 200 ng de fragment d'ADN, 1 mM de dNTP, 10 mM KCl, 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1% Triton X-100, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  BSA et 2.5 unités d'ADN polymérase *Pfu*. On recouvre le mélange réactionnel avec 20  $\mu$ l d'huile et on l'incube à 72°C pendant 30 min. Le mélange obtenu est dessalé sur cartouche Microcon 50 (Amicon INC., USA) et ligaturé dans le vecteur pCR-Script SK(+).

Pour cela, on ajoute 50 ng de fragment de PCR dans un mélange de ligature qui comprend 10 mM KCl, 6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris-HCl pH 8, 0,1% Triton X-100, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  BSA, 10 ng du vecteur de clonage pCR-Script SK(+), 5 unités de l'enzyme de restriction *Sfr*I, 4 unités de T4 ADN ligase et 5 mM de rATP. Cette réaction est incubée pendant 60 min. à 25° C puis est utilisée pour transformer la souche d'*E.coli* XL2-Blue MRF' (Stratagene, USA). On sélectionne les bactéries qui contiennent des vecteurs recombinants, sur boîtes de milieu LB, contenant 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  d'ampicilline, 80  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de méthicilline et en présence d'IPTG et de X-Gal (Sambrook *et al.*, 1989).

A l'issu de la transformation, on a isolé un clone qui abrite le plasmide recombinant pMAN1, décrit à la figure 1 ci-après. Ce vecteur contient le fragment de PCR obtenu précédemment, qui est cloné au site *Sfr*I du vecteur pCR-Script (SK+). Cet ADNc a été séquencé selon le protocole « T7 sequencing kit » (Pharmacia Biotech AB, Björkgatan 30, 75184 Uppsala, Suède), en présence d'alpha-( $^{35}\text{S}$ )-dATP. L'analyse de sa séquence montre qu'il est localisé entre les nucléotides 743 et 1369 de la séquence SEQ ID NO:1 et est bordé à ses extrémités 5' et 3' par les séquences respectives homologues à l'oligonucléotide MAN2. Par comparaison avec la séquence protéique de la mannanase de *Trichoderma reesei* et d'*Aspergillus aculeatus*, on déduit que l'ADNc ainsi cloné correspond à un ADNc partiel de l'endo- $\beta$ -mannanase de café.

Pour isoler l'ADNc pleine longueur de l'endo- $\beta$ -mannanase de café, on a ensuite réalisé une hybridation sur colonies en testant 1800 transformants d'*E.coli* XL2-Blue MRF' de la banque d'ADNc réalisée à partir des grains de café en germination.

Les transformants sont transférés sur un filtre de Nylon Hybond N+ (Amersham International plc., Amersham place, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, UK) selon les recommandations du fournisseur et analysés par hybridation moléculaire avec la sonde MAN1 (50 ng). Cette sonde est obtenue après digestion du vecteur pMAN1 par l'enzyme de restriction *Sma*I. Elle a été purifiée sur gel d'électrophorèse et marquée par extension d'amorce au hasard avec 50 µCi d'alpha-(<sup>32</sup>P)-dCTP selon le protocole du kit Megaprime (Amersham, UK). Après hybridation, lavage et autoradiographie des filtres, on détecte un clone positif qui abrite le vecteur recombinant pMAN2, décrit à la figure 2 ci-après. Ce vecteur contient un fragment d'ADN d'environ 1000 pb qui a été séquencé sur les deux brins (Eurogentec Bel s.a- Parc Scientifique du Sart Tilman – 4102 Seraing-Belgium). Il comprend en fait les 1022 dernières paires de base de la séquence SEQ ID NO:1, mais ne constitue à nouveau qu'un ADNc partiel de l'endo-β-mannanase de café.

Pour isoler l'extrémité 5' de l'ADNc de la mannanase de café, on a réalisé une réaction de PCR selon les conditions décrites précédemment, mais à l'exception des paramètres suivants. On a utilisé 20 ng de la banque d'ADN plasmidique (22 jours de germination), l'oligonucléotide de synthèse MAN60, correspondant à la séquence SEQ ID NO : 5 et les oligonucléotides universels ForM13 et RevM13, qui correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO: 6 et SEQ ID NO: 7. Ces amorces sont chacune localisés à environ 100 pb de part et d'autre du site de clonage *Sfr*I du vecteur pCR-Script SK(+). L'amorce MAN60 est quant à elle localisée entre les nucléotides 803 et 819 de la séquence SEQ ID NO: 1. Après cette réaction, on a obtenu un fragment d'amplification [MAN60/ ForM13] d'environ 900 pb qui a été digéré par l'enzyme de restriction *Sma*I, afin d'éliminer les séquences du plasmide pCR-Script SK(+). Cet ADN digéré a été ligaturé dans le vecteur pCR-Script SK(+) pour donner le vecteur pMAN3 décrit à la figure 3 ci-après. L'analyse de sa séquence révèle qu'il correspond à l'extrémité 5' de l'ADNc codant pour la mannanase de café et qu'il est localisé entre les nucléotides 1 et 819 de la séquence SEQ ID NO: 1.

Comme ces expériences ne nous ont pas permis d'isoler un ADNc pleine longueur codant pour la mannanase de café, nous avons décidé de cribler à nouveau la banque d'ADN plasmidique (22 jours de germination), en utilisant cette fois le kit "ClonCapture cDNA Selection Kit" (Clontech Laboratories Inc.,

1020 East Meadow Circle, Palo Alto California 94303-4230 USA). Dans ce cas, on utilise la sonde MAN3 que l'on obtient par une double digestion du plasmide pMAN3, avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Sac*I. On effectue la biotinylation de cette sonde selon le protocole défini par Clontech (USA) et on l'utilise pour enrichir la banque d'ADNc en plasmide contenant tout ou partie des séquences de l'ADNc codant pour la mannanase de café. Cette banque enrichie a été amplifiée dans *E.coli*, puis a été criblée en utilisant la sonde d'ADNc MAN3 décrite précédemment qui a été marqué par extension d'amorce au hasard selon le protocole du kit Megaprime (Amersham, UK).

A l'issu de ce crible, on a sélectionné notamment un clone positif qui contient un ADNc d'environ 1600 pb cloné dans le vecteur pCR Script SK(+). Ce plasmide recombinant est nommé pMAN4, décrit à la figure 4 ci-après., et l'ADNc qu'il abrite a été séquencé. Son analyse dans la banque de donnée Genbank (release 106.0) (Genetics Computer Group Inc., University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin 53711 USA) a montré qu'il correspond à la totalité de la séquence SEQ ID NO: 1.

#### 4. Analyse de l'ADNc pleine longueur codant pour l'endo- $\beta$ -mannanase de café

L'analyse de la séquence nucléique montre que cet ADNc pleine longueur contient à son extrémité 5' une courte séquence transcrite non traduite de 10 pb et une très longue séquence (36 pb) correspondant à la queue de polyA dans l'extrémité 3' transcrite non traduite de 280 pb. Au sein de cette dernière séquence, on observe l'absence de motifs de AATAAA supposés intervenir dans les mécanismes de polyadénylation mais on constate en revanche la présence de plusieurs motifs nucléiques riches en GT (position) qui pourraient jouer ce rôle (Mogen *et al.*, Plant Cell 2: 1261-1272, 1190)

On constate également la présence de deux séquences répétées inversées, très conservées entre elles ainsi que l'existence de deux grandes séquences répétées directes de 34 pb, en position 1383-1417 et 1440-1474, qui contiennent plusieurs des répétitions du motif nucléique AGT(C/A)A(T/A)(G/A). Les fonctions précises de ses séquences sont inconnues mais l'on peut supposer qu'elles interviennent dans des mécanismes de stabilité des ARNm ou d'efficacité de la traduction par exemple (Gallie, Plant Mol Biol, 32: 145-158, 1996).

La séquence SEQ ID NO: 1 contient une phase ouverte de lecture de 428 codons, qui commence par le codon ATG en position 11 et se termine par un codon TGA en position 1292. La protéine déduite de cet ADNc a un poids moléculaire approximatif de 48349 Da et possède un segment protéique très hydrophobe qui correspond au 30 premiers acides aminés de la séquence SEQ ID NO: 1. Cette séquence protéique pourrait correspondre à une séquence de type peptide signal. Dans ce cas, on s'attend à ce que le poids moléculaire de la protéine soit inférieur ou égal à 45000 Da sous sa forme maturée.

On note aussi l'existence de plusieurs sites potentiels de glycosylation (Asn / X / Ser ou Thr). Les deux premiers sont localisés dans le peptide signal potentiel, en position 8 et 11 de la séquence SEQ ID NO2, et sont donc supposés être absents dans la forme mature de la mannanase. Les deux autres sont localisés en position C-terminale, en position 389 et 412 de la séquence SEQ ID NO: 2. L'un de ces deux sites potentiels doit nécessairement être glycosylé puisque la mannanase de café est effectivement retenue par filtration sur colonne d'affinité à la concanavoline A.

## **Test 2: Mesure du pic d'activité de l'endo- $\beta$ -mannanase durant la germination**

Des grains de la variété *C.arabica* Caturra sont récoltés au stade mature et traités comme défini précédemment lors de l'isolement des ARN.

Les lots de grains sont récoltés à différents stades de germination (JAI 7, 14 ...) puis sont broyés dans l'azote liquide. Ensuite la poudre est homogénéisée à raison de 1g pour 5 ml dans un tampon d'extraction (phosphate-citrate 200/100 mM pH 5, métabisulfite  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  10 mM, EDTA 5 mM, inhibiteur de protéase 'Complete' (cat. n° 1836 145, Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) 1 comprimé/50 ml) pendant 20 min. à 4°C. L'homogénat est ensuite centrifugé à 12000 g pendant 20 min. à 4°C, et le surnageant repris et centrifugé une deuxième fois. Le surnageant, soit l'extrait enzymatique brut, est ensuite aliquoté et placé à -80°C.

L'activité de l'endo- $\beta$ -mannanase est dosée selon la méthode suivante. Un extrait de 400  $\mu\text{l}$  est ajouté à un tampon de réaction, de l'acide acétique-acétate de sodium (200 mM pH 5, NaCl 100 mM) (1,6 ml) contenant du substrat insoluble (AZCL-Galactomannane, Megazyme, Co.Wicklow, Ireland) en quantité finale de

1 % p/v. La réaction débute par l'ajout de l'extrait, et se déroule à 37°C sous agitation. Pour calculer la pente initiale de la réaction, un aliquote de 400 µl de milieu est prélevé toutes les 15 min. pendant 1 heure, chauffé à 100°C pendant 5 min. puis centrifugé à 12000 g pendant 2 min.. La lecture du surnageant se fait à 590 nm. L'activité spécifique est exprimée en unités d'absorption optique ( UA), min<sup>-1</sup> mg protéine<sup>-1</sup>, après avoir dosé la concentration de protéine dans chaque extrait par la méthode de Bradford (Bradford, Anal.Biochem. 72, 248-254, 1976). Ainsi on trouve que l'activité est quasiment nulle pendant les premières 14 JAI, et après augmente progressivement jusqu'à un pic autour de 28 JAI. Après 28 JAI, l'activité baisse lentement.

### Test 3: Etapes de purification de l'endo-β-mannanase

Selon les résultats décrits précédemment la stratégie de purification se poursuit en utilisant au moins 640 ml (750 grains) d'un extrait d'enzyme brut de 28 JAI ayant une activité autour de 1.3 UA, min<sup>-1</sup> mg protéine<sup>-1</sup> x 10<sup>-3</sup>, un contenu de protéines totales d'environ 640 mg, et une activité totale de 832 UA min<sup>-1</sup>.

#### 1. Précipitation au sulfate d'ammonium:

Dans un premier temps l'extrait d'enzyme brut est fractionné par une précipitation au sulfate d'ammonium à 4°C. Le sulfate d'ammonium est ajouté lentement sous agitation jusqu'à un niveau de saturation de 35 % et la solution est ensuite centrifugée à 12000 g à 4°C pendant 20 min. Le précipitat ainsi obtenu à partir de 640 ml d'extrait enzymatique brut est repris dans 16 ml de tampon d'extraction, la concentration de protéine dans cet extrait étant autour de 3 mg ml<sup>-1</sup> et l'activité endo-β-mannanase autour de 13 UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> x 10<sup>-3</sup>, soit un enrichissement de l'enzyme de 10 et une récupération de 624 UA min<sup>-1</sup> de l'activité totale, soit 75 %.

#### 2. Séparation par gel filtration:

Suivant le fractionnement par précipitation en présence de sulfate d'ammonium, l'extrait est déssalé à l'aide d'une colonne PD-10 G-25M

(Pharmacia Biotech, Suède). L'élution est faite avec le tampon d'extraction  
supplémenté par 150 mM NaCl (tampon d'extraction + NaCl). La totalité de  
l'échantillon est ensuite fractionné sur une colonne HiPrep Sephacryl S-200  
(Pharmacia Biotech, Suède), volume 120 ml, préalablement équilibrée avec le  
5 tampon d'extraction + NaCl et calibrée avec les marqueurs du poids moléculaire.  
La séparation est réalisée à 4°C avec un débit de 0.46 ml min<sup>-1</sup> et l'expérience est  
répétée 4 fois, en utilisant chaque fois 4 ml de l'extraction obtenue par  
précipitation au sulfate d'ammonium. Dans ces conditions, pour chaque séparation  
l'activité endo-β-mannanase sort dans un volume total de 13 ml (en fractions de 1  
10 ml) avec un volume de rétention aux alentours de 100 ml, ce qui correspond à un  
poids moléculaire d'environ 50000 Da. L'enrichissement est en moyenne de 9 par  
rapport à l'échantillon injecté sur la colonne avec une activité spécifique autour de  
117 UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> x 10<sup>-3</sup>, un contenu de protéine totale d'environ 2.25 mg et une  
récupération d'activité de l'enzyme par rapport à l'EEB de 31 %.

15 La protéine totale dans les 52 ml de solution est précipitée par un traitement  
de sulfate d'ammonium à 80 % de saturation comme décrit ci-dessus, et la  
protéine est reprise dans 3 ml d'un tampon de Tris-HCl 20 mM pH 8, contenant  
l'inhibiteur de protéase 'Complete' (Boehringer Mannheim, Allemagne), 1  
comprimé 50 ml<sup>-1</sup>. Cette solution est ensuite déssalée comme décrit ci-dessus en  
20 éluant le matériel protéique avec le même tampon Tris-HCl 20 mM pH 8. La  
protéine totale est récupérée dans environ 5 ml, avec une concentration d'environ  
0.4 mg ml<sup>-1</sup> (2 mg total), une activité de 115 UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> x 10<sup>-3</sup>, une activité  
totale de 230 UA min<sup>-1</sup>, une récupération d'activité de l'enzyme par rapport à  
l'EEB de 27 % et un facteur d'enrichissement de 88. Alternativement le matériel  
25 protéique peut être gardé à 4°C dans une solution de Tris-HCl 20 mM pH 8  
contenant 2.5 M sulfate d'ammonium.

### 3. Séparation par échangeuse d'ion:

Des essais étant réalisés préalablement pour établir la titration en fonction du pH de l'activité endo- $\beta$ -mannanase, une colonne de 5 ml de phase stationnaire de DEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech, Suède) est équilibrée avec le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8 à 4°C. L'extrait déssalé décrit ci-dessus (5 ml) est déposé au sommet de la colonne et la séparation se déroule à 4°C sans application de pression supplémentaire. Une fois que l'échantillon a pénétré dans la colonne celle-ci est lavée avec 15 ml du tampon Tris-HCl pH 8. Les protéines sont ensuite éluées avec le même tampon contenant NaCl 500 mM. L'éluat sortant de la colonne est fractionné en cuvettes de 1 ml, contrôlé pour le contenu de protéine à 280 nm et l'activité endo- $\beta$ -mannanase est dosée. Une activité totale de 209 UA min<sup>-1</sup> est récupérée dans 3 fractions, normalement dans les fractions 4, 5 et 6, dans un volume total de 3 ml, avec une concentration de protéine d'environ 110  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  et une activité spécifique de 639 UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>  $\times 10^{-3}$ . Ainsi, cet échantillon est enrichi de l'activité endo- $\beta$ -mannanase d'un facteur de 491 par rapport à l'EEB et représente une récupération de l'activité totale originale de 24 %.

### 4. Séparation par colonne d'affinité-Concanavaleine A:

Cette étape se déroule dans les mêmes conditions que la séparation précédente. Une colonne est préparée avec 2 ml de phase stationnaire de Concanavaleine A Sepharose (Pharmacia Biotech, Suède), équilibrée avec 20 ml d'un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM. L'échantillon décrit ci-dessus (3 ml) est déposé sur la colonne, puis la colonne est lavée avec 10 ml du tampon d'équilibration. L'élution se fait avec le même tampon contenant 300 mM méthyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside (Sigma, St Louis, MO, USA, cat. n° M-6882) et l'éluat est fractionné en cuvettes de 1 ml, contrôlé à 280 nm et l'activité endo- $\beta$ -mannanase dosée. L'activité totale endo- $\beta$ -mannanase enrichie se distribue entre trois fractions de 1 ml, l'ensemble ayant une concentration de protéine moyenne autour de 1  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , une activité spécifique de 3500 UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>  $\times 10^{-3}$ , soit un enrichissement de 2.690, et une activité totale de 105 UA min<sup>-1</sup>, ce qui représente une récupération de l'activité totale par rapport à l'EEB d'environ 12 %.

Une analyse de cette fraction par SDS-PAGE révèle la présence d'une bande protéique majeure ayant un poids moléculaire entre 45000 et 50000 Da.

## LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATIONS GENERALES:  
 (i) DEPOSANT:  
 (A) NOM: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A  
 (B) RUE: AVENUE NESTLE 55,  
 (C) VILLE: VEVEY  
 10 (D) ETAT OU PROVINCE: VAUD  
 (E) PAYS: SUISSE  
 (F) CODE POSTAL: 1800  
 (G) TELEPHONE: 021 924 34 20  
 (H) TELECOPIE: 021 924 28 80  
 15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: MANNANASE DE CAFE  
 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 7  
 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:  
 (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
 20 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:  
 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 1613 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: double  
 (D) CONFIGURATION: linéaire  
 30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TTCATTAAAA	ATGGCCTTCT	CCAGGAGAAG	CAATATCAGC	AACTTCTCTT	GCTGCTTCCT	60
35 TGTGATCATC	GTCTTATCCC	TGCATTGCGA	AAATCATATA	GTTTCTTCTT	CTGCTTCGCG	120
CTTTATTCAA	ACAAGAGGAA	CCCGATTTCG	GTTAGGTGGC	TACCCATTTT	TTTTCAATGG	180
GTTCAACTCC	TACTGGATGA	TGCATGTTGC	AGCTGAGCCA	AGTGAAAGGC	ATAAAATTTT	240
40 CAATGTATTT	CGCGAGGCTG	CTGCTACAGG	GCTTACTGTT	TGCCGGACAT	GGGCATTCAG	300
CGATGGTGGC	GATCGAGCTC	TTCAAATGTC	CCCCGGAGTC	TATGATGAAC	GTGTCTTTCA	360
45 GGCCCTTGAT	TTTGTGGTAT	CGGAAGCAAG	GAAGTATGGA	GTTCACTTAA	TCCTGAGTCT	420
GACCAACAAC	TACAAGGACT	TTGGAGGAAG	GACGCAATAC	GTGACGTGGG	CTAAAAATGC	480
CGGAGTACAA	GTGAATAGCG	ATGATGATTT	TTACACCAAG	AATGCTGTCA	AGGGATATTA	540
50 CAAGAATCAC	ATTAAGAAAAG	TGTTGACTAG	GATCAACACA	ATCAGTAGAG	TTGCATATAA	600
AGATGATCCA	ACAGTCATGG	CATGGGAGCT	AATAAATGAA	CCTCGTTGCC	AGGTGCACTT	660
55 CTCCGGAAAA	ACCTTAAATG	CTTGGGTTCA	AGAAATGGCA	ACTTACGTCA	AATCACTCGA	720
TAACAAACAC	CTTCTAGAAA	TAGGCATGGA	GGGATTCTAC	GGAGATTCAA	TGCCAGGCAA	780



AAAGCAGTAC AATCCTGGAT ACCAAGTGGG CACAGATTTT ATCACCAATA ATCTTATCAA 840  
 AGAGATAGAT TTTGCAACCA TTCATGCATA TCCCGATATT TGGCTGTCTG GACAGAGCGA 900  
 5 CGGTGCACAG ATGATGTTCA TGAGAAGGTG GATGACCAGT CACTCCACAG ACTCTAAGAC 960  
 CATACTTAAA AAACCATTGG TTCTCGCTGA ATTTGGGAAA TCAAGTAAAG ATCCAGGATA 1020  
 10 CAGTTTATAT GCCAGGGAGT CATTTCATGGC CGCAATTTAC GGTGATATCT ACAGGTTTGC 1080  
 TAGAAGAGGA GGCATTGCAG GTGGATTGGT TTGGCAAATC CTGGCCGAGG GAATGCAACC 1140  
 GTACGCAGAT GGGTATGAAA TTGTCTTGTC TCAGAACCCA TCAACCGGAC GAATCATAAG 1200  
 15 CCAACAGTCT CGACAAATGA CTTCACTCGA CCATATGAGC AGTAATAGAA CCAATTCTCA 1260  
 AAGCAACAAA CTGCGCAATT CAAAGGAGCA GTGATCAGTC TTCCAGAAAAG TCTACTTGAG 1320  
 20 TTTGTTTCGTA TGTCAAAATC AAGTATCAAC CATAGAAATT TCCATTATAT TCGGAGTGTT 1380  
 TTAGTCAAGT TCTAGTAATA CCGCTGGAGT CATGATAGTT ATGACAGTAA TACCGCTGGA 1440  
 GTCAAGTTCT AGTAATACCG TTGGAGTCAA GTTATGATAG TTATTTAAAA ATTAGTATTT 1500  
 25 TATTACAAAT TTGTTATTGT TGTGAGACTT GTTTATTAAG TAAATGGAAA GTCTTATCAT 1560  
 TATTATCATT TGAGAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 1613

30

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 427 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

35 (C) NOMBRE DE BRINS:

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

40 Met Ala Phe Ser Arg Arg Ser Asn Ile Ser Asn Phe Ser Cys Cys Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Val Ile Ile Val Leu Ser Leu His Cys Glu Asn His Ile Val Ser  
 20 25 30  
 45 Ser Ser Ala Ser Arg Phe Ile Gln Thr Arg Gly Thr Arg Phe Val Leu  
 35 40 45  
 Gly Gly Tyr Pro Phe Phe Phe Asn Gly Phe Asn Ser Tyr Trp Met Met  
 50 50 55 60  
 His Val Ala Ala Glu Pro Ser Glu Arg His Lys Ile Ser Asn Val Phe  
 65 70 75 80  
 55 Arg Glu Ala Ala Ala Thr Gly Leu Thr Val Cys Arg Thr Trp Ala Phe  
 85 90 95

20

Ser Asp Gly Gly Asp Arg Ala Leu Gln Met Ser Pro Gly Val Tyr Asp  
 100 105 110  
 5 Glu Arg Val Phe Gln Ala Leu Asp Phe Val Val Ser Glu Ala Arg Lys  
 115 120 125  
 Tyr Gly Val His Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Asn Tyr Lys Asp Phe  
 130 135 140  
 10 Gly Gly Arg Thr Gln Tyr Val Thr Trp Ala Lys Asn Ala Gly Val Gln  
 145 150 155 160  
 Val Asn Ser Asp Asp Asp Phe Tyr Thr Lys Asn Ala Val Lys Gly Tyr  
 165 170 175  
 15 Tyr Lys Asn His Ile Lys Lys Val Leu Thr Arg Ile Asn Thr Ile Ser  
 180 185 190  
 20 Arg Val Ala Tyr Lys Asp Asp Pro Thr Val Met Ala Trp Glu Leu Ile  
 195 200 205  
 Asn Glu Pro Arg Cys Gln Val Asp Phe Ser Gly Lys Thr Leu Asn Ala  
 210 215 220  
 25 Trp Val Gln Glu Met Ala Thr Tyr Val Lys Ser Leu Asp Asn Lys His  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Glu Ile Gly Met Glu Gly Phe Tyr Gly Asp Ser Met Pro Gly  
 245 250 255  
 30 Lys Lys Gln Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Gly Thr Asp Phe Ile Thr  
 260 265 270  
 35 Asn Asn Leu Ile Lys Glu Ile Asp Phe Ala Thr Ile His Ala Tyr Pro  
 275 280 285  
 Asp Ile Trp Leu Ser Gly Gln Ser Asp Gly Ala Gln Met Met Phe Met  
 290 295 300  
 40 Arg Arg Trp Met Thr Ser His Ser Thr Asp Ser Lys Thr Ile Leu Lys  
 305 310 315 320  
 Lys Pro Leu Val Leu Ala Glu Phe Gly Lys Ser Ser Lys Asp Pro Gly  
 325 330 335  
 45 Tyr Ser Leu Tyr Ala Arg Glu Ser Phe Met Ala Ala Ile Tyr Gly Asp  
 340 345 350  
 50 Ile Tyr Arg Phe Ala Arg Arg Gly Gly Ile Ala Gly Gly Leu Val Trp  
 355 360 365  
 Gln Ile Leu Ala Glu Gly Met Gln Pro Tyr Ala Asp Gly Tyr Glu Ile  
 370 375 380  
 55 Val Leu Ser Gln Asn Pro Ser Thr Gly Arg Ile Ile Ser Gln Gln Ser  
 385 390 395 400

21

Arg Gln Met Thr Ser Leu Asp His Met Ser Ser Asn Arg Thr Asn Ser  
405 410 415

5 Gln Ser Asn Lys Leu Arg Asn Ser Lys Glu Gln  
420 425

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
15 (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE DE  
SYNTHESE"  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

20 GGNATGGARG GNTTYTAYGG 20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 15 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
30 (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE DE  
SYNTHESE"  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTTTTTTTTT TTTT 15

## 35 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 17 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
40 (D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(A) DESCRIPTION: /desc = "NUCLEOTIDE DE SYNTHESE"  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

45 AAATCTGTGC CCACTTG 17

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- 50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 17 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
55 (A) DESCRIPTION: /desc = "NUCLEOTIDE DE SYNTHESE"  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

22

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
    (A) LONGUEUR: 17 paires de bases  
    (B) TYPE: nucléotide  
    (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
    (D) CONFIGURATION: linéaire  
10 (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
    (A) DESCRIPTION: /desc = "NUCLEOTIDE DE SYNTHESE"  
    (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAGGAAACAG CTATGAC

17

15

20

25

30

35

40

45

09. 11. 1998

**Revendications**

1. Fragment d'ADN issu de café codant pour au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiés liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).  
5
2. Fragment d'ADN selon la revendication 1 codant pour au moins une endo- $\beta$ -mannanase.
- 10 3. Fragment d'ADN selon les revendications 1 et 2 présentant la séquence nucléique SEQ ID NO:1.
4. Fragment d'ADN selon la revendication 3 comprenant au moins les nucléotides 11 à 1292 de la séquence nucléique SEQ ID NO:1.  
15
5. Fragment d'ADN qui est homologue ou qui s'hybride à un fragment d'ADN selon l'une des revendications 3 et 4.
6. Vecteur recombinant comprenant un fragment d'ADN selon l'une des revendication 3 à 5.  
20
7. Utilisation de tout ou partie de fragments d'ADN selon les revendications 3 à 5, d'au moins 10pb, comme amorce pour faire une PCR ou comme sonde pour détecter *in vitro* ou modifier *in vivo* au moins un gène de café codant pour au moins une endo- $\beta$ -mannanase.  
25
8. Protéine issue de la graine de café codée par un gène de café et impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiés liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4) et ayant la séquence en acides aminée SEQ ID NO:2 ou toute séquence en acides aminés homologue à cette dernière.  
30
9. Cellule végétale comprenant, intégré dans son génome ou par le moyen d'un vecteur recombinant, un fragment d'ADN codant pour au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de  
35

molécules de mannanes pures ou ramifiées liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).

- 5 10. Cellule végétale selon la revendication 9 comprenant un fragment d'ADN selon l'une des revendications 3 à 5.
11. Cellule végétale selon les revendications 9 et 10 caractérisée par le fait qu'il s'agit d'une cellule de café.
- 10 12. Plante ou graine constituées de cellules végétales selon l'une des revendications 9 à 11.
- 15 13. Microorganisme comprenant, intégré dans son génome ou par le moyen d'un plasmide replicable, un fragment d'ADN selon l'une des revendications 3 à 5 de manière à ce qu'il exprime au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiées liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).
- 20 14. Composition alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique comprenant un fragment d'ADN selon les revendications 1 à 5 ou une protéine selon la revendication 8.
- 25 15. Procédé de traitement de grains de café, dans lequel on utilise toute ou partie de la protéine selon la revendication 8.

09. 11. 1998 25

**Abrégé****Mannanase de café**

- 5 Fragment d'ADN issu de café codant pour au moins une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de polysaccharides constitués au moins de molécules de mannanes pures ou ramifiés liés entre elles par une liaison  $\beta$  (1->4).





EPO - DG 1

09. 11. 1998

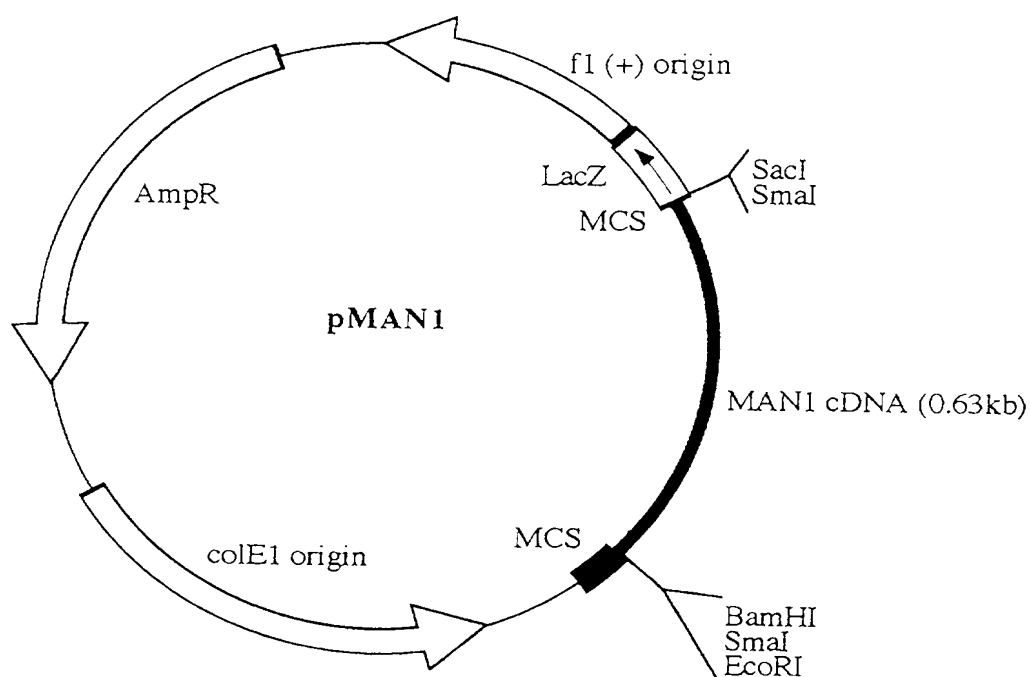


Fig 1/4

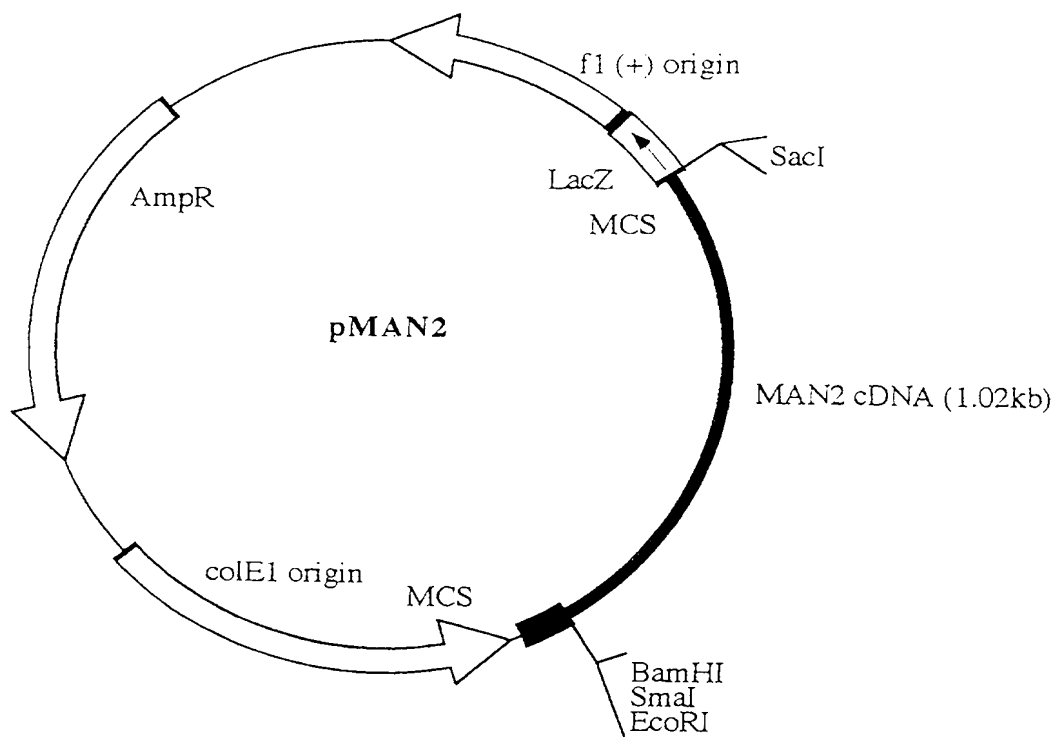


Fig 2/4

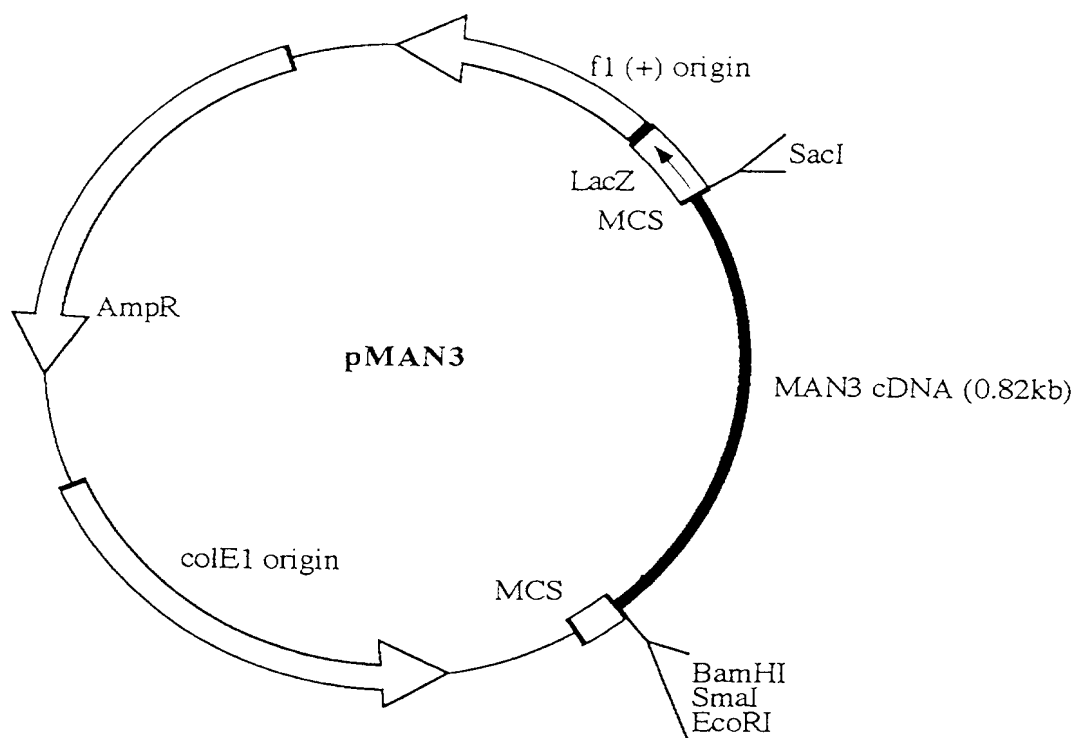


Fig 3/4

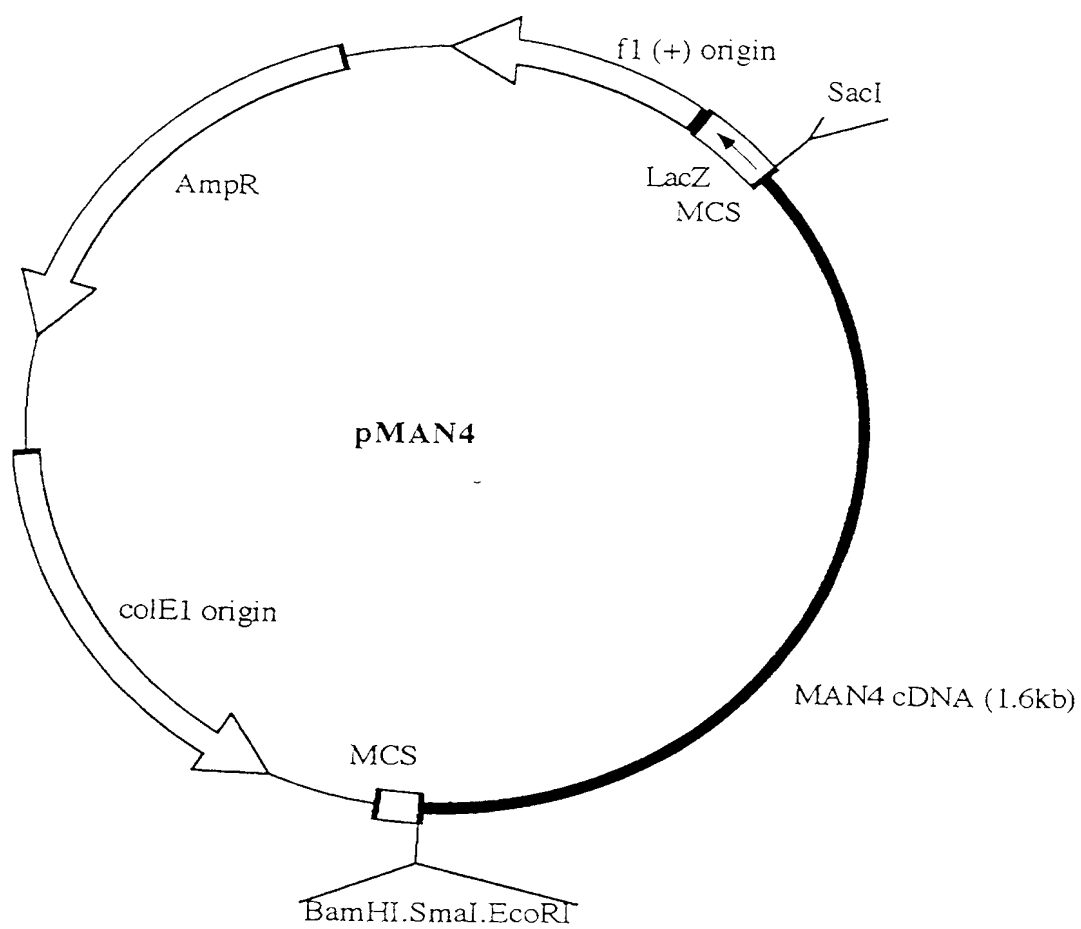


Fig 4/4